

GEGENSEITIGE BEEINFLUSSUNG VON
PHARMAKA BEI IHRER BINDUNG AN
HUMANHÄMOGLOBIN

GISELA TOYKA

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität
München

Direktor: Prof. Dr. M. Kiese

Gegenseitige Beeinflussung von Pharmaka bei ihrer
Bindung an Humanhämoglobin

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Gisela Toyka

München, 1974

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Kurz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Kiese

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.6.74



E I N L E I T U N G

Die meisten niedermolekularen Substanzen im Organismus sind in unterschiedlichem Maße reversibel an Eiweißkörper in Blut und Gewebe gebunden. Während körpereigene Stoffe wie Hormone (ROSENBAUM et al., 1966; GOLDSMITH et al., 1967; De MOOR und HEYNS, 1968) und Vitamine (BAKER et al., 1967; RICKERS und De LUCA, 1967) vorwiegend an α - und β -Globuline des Plasmas gebunden werden, die oft Substanz-spezifisch sind, erfolgt die Bindung körperfremder Stoffe im Plasma vornehmlich an Albumin (GOLDSTEIN, 1949; BRODIE, 1950; SCHOLTAN, 1964, u.a.). Die Bindung ist für die Pharmakokinetik dieser Stoffe und damit auch für ihre Wirkung von Bedeutung (BRODIE und HOGBEN, 1957; WITZGALL und BOYENS, 1964; MEYER und GUTTMAN, 1968). Für Chemotherapeutika gilt heute die Ansicht, daß nur der freie, nicht an Proteine gebundene Anteil der Substanz pharmakologisch wirksam ist, während sich der gebundene Anteil inaktiv verhält. Für andere Pharmaka ist eine Beziehung zwischen Proteinbindung und Wirkung insoweit unbestritten, als das Ausmaß der Bindung einer Substanz über eine Beeinflussung von Verteilung, Metabolisierung und Ausscheidung mit deren Wirkung in einem mittelbaren Zusammenhang steht. Die Bedeutung der Proteinbindung für die Pharmakokinetik ist von MARTIN, 1965, und MEYER und GUTTMAN, 1968, an Modellen gezeigt worden.

Bei der Proteinbindung sind vor allem drei Bindungsarten zu beschreiben: Ionen-Bindung, Bindung über Wasserstoffbrücken und hydrophobe Bindung. Die früher vielfach geäußerte Ansicht, daß die elektrische Ladung einer Substanz für ihre Bindung an Eiweißkörper, d.h. die Ionen- und Wasserstoffbrückenbindung, allein von

entscheidender Bedeutung sei (SCATCHARD, 1949; KLOTZ und URQUART, 1959; KEEN, 1966), wird von den meisten Autoren nicht mehr geteilt. Man nimmt heute an, daß es sich bei der Proteinbindung einer Reihe von Substanzen um eine hydrophobe Wechselbeziehung handelt (HANSCH et al., 1962; SCHOLTAN, 1964; NÉMETHY, 1967; BIRD und MARSHALL, 1967). Sie beruht darauf, daß der Übertritt eines, verglichen mit Wasser weniger polaren Moleküls aus der wässrigen Phase an die unpolaren Gruppen eines Proteins energetisch begünstigt ist. Die treibende Kraft bei der Ausbildung einer hydrophoben Bindung stellt die Zunahme der Entropie dar (KAUZMANN, 1959; KIEHS et al., 1966).

Man kann sich vorstellen, daß bei Anwendung von mehr als einer niedermolekularen Substanz eine Konkurrenz um die Bindungsstellen auftreten kann. Dieser Effekt kann auch als Verdrängung einer Substanz durch eine weitere aufgefaßt werden (MEYER und GUTTMANN, 1968). Es ist zweckmäßig, verdrängte Substanzen als "Primärsubstanzen", verdrängende als "Sekundärsubstanzen" zu bezeichnen. Eine Sekundärsubstanz wird nur dann eine nennenswerte Verdrängung bewirken, wenn entweder ihre Konzentration sehr hoch ist oder ihre Affinität zum Protein höher ist als die der Primärsubstanz.

Bei der kompetitiven Verdrängung handelt es sich um eine Konkurrenz zweier Substanzen um dieselbe(n) Bindungsstelle(n) des Proteinmoleküls. Eine nicht-kompetitive Verdrängung läßt sich durch einen allosterischen Effekt erklären, d.h. eine Substanz bewirkt bei ihrer Bindung eine Strukturänderung des Proteins, wodurch die Bindungsaffinität eines weiteren Pharmakons verändert wird. Zahlreiche Autoren haben diesen Mechanismus durch ihre Untersuchungen belegt: ANTON, 1960; WISHINSKY et al., 1962; DUBACH et al., 1966; KEEN, 1966; KUNIN, 1966; SOLOMON und SCHROGIE, 1967; BAUR, 1969; LUNDE et al.,

1970 u.a.. Alle diese Untersuchungen wurden mit Plasma-proteinen oder Albumin durchgeführt.

Unter bestimmten Voraussetzungen kann offenbar eine Sekundärsubstanz die Bindung der Primärsubstanz erhöhen. So konnte BAUR, 1969, zeigen, daß die Bindung des Thiopentals an Rinderalbumin durch Phenylbutazon verstärkt wurde. JÄHNCHEN et al., 1968, sowie FRANZ et al., 1969, fanden ein ähnliches Phänomen bei Promazin, dessen Eiweißbindung durch Suramin stark erhöht wurde. Dieser Effekt wird dadurch erklärt, daß Suramin eine Schwellung und Auffaltung des Albuminmoleküls bewirkt, wodurch möglicherweise die Zahl der Bindungsstellen vermehrt wird.

Im Gegensatz zur Vielzahl der Arbeiten über die Bindung von Plasmaproteinen finden sich überraschend wenige Hinweise auf die Bedeutung des Hämoglobins als Arzneimittel-bindendes Protein, obwohl die Hämoglobinkonzentration im Blut viermal so hoch wie die des Albumins ist. In vivo ist es für die Bindung einer Substanz an Hämoglobin allerdings Voraussetzung, daß diese schnell und vollständig die Erythrozytenmembran durchdringt. Wie HUTCHINSON, 1962, SCHANKER, 1964, und KURZ, 1970, zeigen konnten, nimmt die Penetrationsfähigkeit mit steigender Lipidlöslichkeit der Substanzen zu und erfolgt in zum Teil nicht meßbar kurzer Zeit.

Bindungsbestimmungen mit Hämoglobin wurden von SCHANKER, 1961, und 1964, und von KIEHS et al., 1966 für einige aromatische Verbindungen durchgeführt. Es zeigte sich, daß die verwendeten Substanzen in hohem Maße an Hämoglobin gebunden werden. Erst HILZENBECHER, 1972, untersuchte die Hb-Bindung einer Reihe von Pharmaka und fand der Bindung an Plasmaeiweiß vergleichbare Werte. Er wies darauf hin, daß selbst bei niedrigen relativen Bindungs-

werten die gesamte, an Hb gebundene Menge des Arzneimittels auf Grund der hohen HB-Konzentration (s.o.) größer sein kann als die im Plasma gebundene.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, eine mögliche gegenseitige Beeinflussung verschiedener Arzneimittel bei ihrer Bindung an Humanhämoglobin zu untersuchen.

M E T H O D I K

A. Herstellung der Hämoglobinlösung

Als Ausgangsmaterial dienten weitgehend plasmafreie Blutkonserven, welche vor der Verarbeitung bis zu 21 Tagen bei $+4^{\circ}\text{C}$ gelagert worden waren (Blutbank Rasch, München). Um individuelle Schwankungen auszugleichen, wurden jeweils mindestens 10 Konserven gleichzeitig verarbeitet.

1. Herstellung eines gereinigten Erythrozytenkonzentrates

Durch Zentrifugieren bei 2000 g wurden das restliche Plasma und die Leukozyten- sowie Thrombozytenschicht entfernt. Anschließend wurde 1 Teil des Erythrozytensediments mit 2 Teilen eines blutisotonen, $1/8$ molaren Phosphatpuffers versetzt und diese Lösung 30 min bei 2000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Nach zweimaligem Wiederholen dieses Waschvorgangs wurden die sedimentierten Erythrozyten umgefüllt und erneut 30 min zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die so von Plasmaproteinen gereinigten Erythrozyten bis zur weiteren Verarbeitung bei -30°C eingefroren.

2. Herstellung des Hämolysates aus Erythrozytenkonzentrat

Das tiefgefrorene Erythrozytenkonzentrat wurde bei 20°C im Wasserbad aufgetaut. Ein Teil der Erythrozyten war danach bereits hämolysiert. Die vollständige Hämolyse wurde durch Ultraschall herbeigeführt: in Portionen von 100 ml wurde das Erythrozytenkonzentrat im Eiswasserbad mit einem MSE ULTRASONIC DISINTEGRATOR (100 W) dreimal 30 sec lang beschallt (Beschallungsfrequenz 22 kHz bei einer Eintauchtiefe des Titanstabes von etwa

1 cm).

3. Herstellung der bei den Versuchen verwendeten Hämoglobinlösung

Die zur Bestimmung der Bindung von Pharmaka an Hämoglobin verwendete HB-Lösung besaß eine Konzentration von 25 ± 1 g Hb/100 ml, entsprechend einer $3,9 \times 10^{-3}$ molaren Lösung. Die Konzentration des Ultraschall-Hämolysates war zum Teil wesentlich höher (bis zu 35 g Hb/100 ml), so daß entsprechende Verdünnungen vorgenommen werden mußten. Dazu wurde Phosphatpuffer pH 7,4, $1/8$ molar, verwendet. Mögliche pH-Abweichungen wurden mit NaH_2PO_4 - bzw. Na_2HPO_4 -Lösung ausgeglichen. Die Bestimmung der Hämoglobinkonzentration erfolgte durch photometrische Messung des mit Dithionit reduzierten Hämoglobins bei einer Wellenlänge von 555 m μ am Beckmann-Photometer (KURZ und WALLER, 1955).

B. Dialyse

1. Verfahren und Hilfsmittel

Zur Bestimmung der Bindung von Substanzen an Humanhämoglobin wurde das Verfahren der Gleichgewichtsdialyse angewandt (FRIEMEL, 1968).

Als semipermeable Membran dienten Visking-Dialysierschläuche Typ 8/32 * mit einer Breite von 10 mm (ungefüllt), einer Wandstärke von 0,05 mm und einer mittleren Porenweite von $15-20 \times 10^{-8}$ cm. Die Füllungsvolumina betrugen in jedem Falle 10 ml. Die mit Hb-Lösung gefüllten Schläuche wurden unter leichter Spannung zugeknotet, um einen Verdünnungseffekt der Hb-Lösung durch einströmendes Wasser möglichst gering zu halten.

Die Dialyse erfolgte bei $+4^\circ\text{C}$ über mindestens 40 Stunden in dem an anderer Stelle (FRIEMEL, 1968) beschriebenen

* Fa. Serva Feinbiochemica, Heidelberg

Dialysiergerät.

2. Zusammenstellung der Ansätze

Der Außenflüssigkeit (Pufferlösung) wurde eine definierte Menge einer Substanz (Primärsubstanz) zugesetzt. Nach erfolgter Einstellung des Dialyse-Gleichgewichtes wurde die Konzentration dieser Substanz in der Außenflüssigkeit gemessen und mit dem Leeransatz verglichen, der kein Hämoglobin enthielt. Aus diesen Größen ließ sich nach den unten aufgeführten Gleichungen der an Hämoglobin gebundene Anteil mittelbar errechnen.

Eine Verdrängung von Substanzen aus ihrer Bindung an Hämoglobin ließ sich nach dem selben Prinzip ermitteln, indem in weiteren Dialysiersystemen der Außenflüssigkeit zusätzlich zur ersten Substanz eine bekannte Menge einer zweiten (Sekundärsubstanz) zugesetzt wurde. Gemessen wurde auch hier die Konzentration der Primärsubstanz.

Im einzelnen waren die in Tabelle 1 angegebenen Ansätze für die gesamte Versuchsdurchführung notwendig. Die Ansätze 1,3,5 und 7 wurden je dreifach angesetzt, die Ansätze 2 und 4 je 6-fach und die Ansätze 6 und 8 je 15-fach. Bei jedem Versuch waren also 54 Dialysiersysteme erforderlich. Die Extinktion der Ansätze 1 - 5 sowie 7 wurden jeweils gemittelt (E_0 bis E_3 ; E_0' und E_2'). Aus den je 15 Werten für E_1' bzw. E_3' wurde für jeden einzelnen unter Verwendung der Mittelwerte (s.o.) der gebundene Anteil berechnet.

3. Berechnung des gebundenen Anteils β

β ist definiert als prozentualer, gebundener Anteil der gesamten, im System anwesenden Substanzmenge.

Entwicklung der Gleichungen zur Berechnung von β :

Die Gesamtmenge der Primärsubstanz im Dialysiersystem o hat die stattgehabte Bindung (Ansatz 2 bzw. 4) muß

Schlauchinhalt Volumen S=10 ml		Außenflüssigkeit Volumen D=10 ml	Extinktion der Außen- flüssigkeit	Bestimmt wird:
1	Puffer	Puffer ohne Substanz	E_0	Blindwert Puffer
2	Puffer	Puffer mit Primärsubstanz	E_1	Konzentration Primärsubst.
3	Puffer	Puffer mit Sekundärsubst.	E_2	Kontrolle
4	Puffer	Puffer mit Primär- und Sekundärsubst.	E_3	Konzentration Primärsubst.
5	Hb-Lösung	Puffer	E_0'	Blindwert Hb-Lösung
6	Hb-Lösung	Puffer mit Primärsubstanz	E_1'	Konzentration Primärsubst.
7	Hb-Lösung	Puffer mit Sekundärsubst.	E_2'	Kontrolle
8	Hb-Lösung	Puffer mit Primär- und Sekundärsubst.	E_3'	Konzentration Primärsubst.

Tabelle 1:

Erforderliche Ansätze (vgl. Text). Als Puffer wurde Phosphatpuffer pH 7,4; 1/8molar verwendet.

gleich der Gesamtmenge der Primärsubstanz im Dialysiersystem nach stattgehabter Bindung (Ansatz 6 bzw. 8) sein.

$$1) \quad m_2 = m_6 \quad \text{und} \quad m_4 = m_8$$

Zur Vereinfachung wird die weitere Entwicklung der Gleichungen nur für Ansatz 2 und 6 gezeigt; für die Ansätze 4 und 8 verläuft sie entsprechend.

m_2 und m_6 setzen sich aus folgenden Teilen zusammen:

$$2) \quad m_2 = m_{2a} + m_{2i} + m_{2s}$$

m_{2a} = Menge im Außenvolumen

m_{2i} = Menge im Schlauchvolumen

m_{2s} = Menge, die an den Schlauch adsorbiert ist

Entsprechend gilt:

$$3a) \quad m_6 = m_{6a} + m_{6i} + m_{6s}$$

m_{6a} = Menge im Außenvolumen nach Bindung

m_{6i} = Menge im Schlauchvolumen nach Bindung, die sich aus m_f = freie, im Lösungswasser gelöste Menge und m_g = an Hämoglobin gebundene Menge zusammensetzt

m_{6s} = Menge, die an den Schlauch adsorbiert ist

$$3b) \quad m_6 = m_{6a} + m_f + m_g + m_{6s}$$

Aus den Gleichungen 1, 2 und 3b ergibt sich, da

$m_{2s} = m_{6s}$ ist, für die gebundene Menge:

$$4) \quad m_g = m_{2a} + m_{2i} - m_f$$

Die entsprechenden Konzentrationen c ergeben sich durch Division der Mengen durch die Volumina, in denen sie gelöst sind. Das lösende Volumen V_a der Außenflüssigkeit ist in allen 8 Ansätzen gleich groß und mit dem pipetierten Volumen D identisch. Das Volumen V_i des Schlauchinhaltes stimmt nur in den Ansätzen 1 - 4 mit dem pipet-

tierten Volumen V_s überein und ist gleich V_a . In den Ansätzen 5 - 8 stimmt das Volumen des Lösungswassers V_{LW} nicht mit dem pipettierten Volumen S überein, sondern das Volumen S ist um das Volumen des Hämoglobianteils vermindert (zur Berechnung des partiellen Hb-Volumens s.u.).

Somit entsprechen den auf der rechten Seite der Gleichung 4 angegebenen Mengen folgende Konzentrationen:

$$5) \quad c_{2a} = \frac{m_{2a}}{V_a} \quad ; \quad c_{2i} = \frac{m_{2i}}{V_i}$$

$$c_{6a} = \frac{m_{6a}}{V_a} \quad ; \quad c_f = \frac{m_f}{V_{LW}}$$

c_f = Konzentration der freien, im Lösungswasser gelösten Menge

Nach Einstellung des Dialysegleichgewichtes in den Ansätzen 2 und 6 gleichen einander auch die entsprechenden Konzentrationen:

$$6a) \quad c_{2a} = c_{2i} \quad 6b) \quad c_f = c_{6a}$$

Damit läßt sich die Gleichung 4 folgendermaßen schreiben:

$$7) \quad m_g = 2 \cdot c_{2a} \cdot V_a - (c_{6a} \cdot V_a + c_{6a} \cdot V_{LW})$$

Wird die gebundene Substanzmenge als Bruchteil der Gesamtmenge im Schlauch des Ansatzes 6 ausgedrückt, so erhält man für die Bindung:

$$8) \quad B = \frac{m_g}{m_f + m_g}$$

Mit Hilfe der Gleichungen 5, 6b und 7 läßt sich B so formulieren:

$$9a) \quad B = 1 - \frac{c_{6a} \cdot V_{LW}}{V_a \cdot (2 \cdot c_{2a} - c_{6a})}$$

Die Konzentrationen ergeben sich aus den Extinktionen, wobei von E_1' die Extinktion des Blindwertes E_0' und von E_1 die Extinktion des Blindwertes E_0 abgezogen werden muß. Da die Extinktionsbestimmungen in einem Bereich vorgenommen wurden, in dem das Lambert-Beer'sche Gesetz erfüllt ist, ist es möglich, mit den relativen Werten der Extinktion zu rechnen.

Bei Multiplikation von B mit dem Faktor 100 und unter Berücksichtigung, daß $V_a = D = 10$ ml ist, ergibt sich der gebundene Anteil B in Prozent:

$$9b) \quad B(\%) = 100 - \frac{V_{LW} (E_1' - E_0') \cdot 100}{20(E_1 - E_0) - 10(E_1' - E_0')}$$

Der freie Anteil α ergibt sich aus Gleichung

$$9c) \quad \alpha(\%) = 100 - B$$

4. Berechnung des partiellen Hämoglobinvolumens bzw. des lösenden Wasservolumens einer Hb-Lösung (NETTER, 1959)

Gibt man 1 g eines trockenen Proteins zu einer Lösung, so erfährt diese eine Volumenzunahme von V' . V' ist das spezifische Volumen eines Proteins und hat die Dimension ml/g. Es beträgt für Humanhämoglobin 0,749 ml/g. Multipliziert man diese Größe mit der Hämoglobinmenge in Gramm, die in einem bestimmten Volumen enthalten ist, so erhält man das partielle Hämoglobinvolumen, d.h. das Volumen, das von den Proteinmolekülen selbst eingenommen wird. Nach Subtraktion des partiellen Hb-Volumens vom Gesamtvolumen der Lösung erhält man das lösende Wasservolumen oder "Volumen des Lösungswassers". Bei der verwendeten Hb-Lösung von 25 ± 1 g/100 ml errechnet sich das Volumen des Lösungswassers mit $8,12 \pm 0,8$ ml.

C. Substanzen und Nachweismethoden

Die Bestimmung der Substanzkonzentrationen erfolgte photometrisch bzw. fluoreszenzphotometrisch. Die Messung der Extinktion konnte in der Regel erst nach Abtrennung störender Beimengungen durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurden die Substanzen nach Ansäuern bzw. Alkalisieren aus der Außenflüssigkeit in ein Lipoidlösungsmittel extrahiert und anschließend in Lauge bzw. Säure reextrahiert.

In Tabelle 2 finden sich die bei den Untersuchungen verwendeten Substanzen mit Angabe des Handelsnamens und des Herstellers. In Spalte 2 ist die Konzentration der Substanz in der Außenflüssigkeit des Dialysiersystems bei Beginn der Dialyse angegeben. Die Verteilungskoeffizienten in Spalte 4 (als dekadischer Logarithmus angegeben) entstammen der Übersicht von LEO et al., 1971, und beziehen sich auf das System Octanol-Wasser.

Folgende Nachweismethoden wurden angewandt:

D e s i p r a m i n wurde nach Alkalisieren mit in NaOH-Lösung in Petroläther extrahiert und anschließend in 0,1n HCl reextrahiert. Messung bei 250 mp.

P r o m a z i n, **C h l o r p r o m a z i n** und **P r o m e t h a z i n** wurden nach der Methode von SALZMANN und BRODIE, 1956, bestimmt: nach Alkalisieren mit 2,5n NaOH-Lösung Extraktion in Petroläther und Reextraktion mit 0,1n HCl. Messung bei 252 bzw. 255 mp.

P h e n p r o c o u m o n wurde nach der Methode von SEILER und DUCKERT, 1968, modifiziert, bestimmt: nach Ansäuern mit 10 % HCl Extraktion in 1,2 - Dichloräthan, Reextraktion in 2,5n NaOH. Messung fluoreszenzphoto-

Tabelle 2:

Zusammenstellung der Primär- bzw. Sekundärsubstanzen. Angegeben sind die bei Dialysebeginn in der Außenflüssigkeit vorhandenen Konzentrationen, die Molekulargewichte und die Verteilungskoeffizienten (Octanol-Wasser) als log P.

Substanz	Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Mol. Gew. (g)	log P
Desipramin-HCl (PERTOFRAN, Roche)	30,2	302	4,28 (pH 7,4)
Chlorpromazin-HCl (MEGAPHEN, Bayer)	35,5	355	5,16 (pH 7,4)
Promazin-Phosphat (VEROPHEN, Bayer)	38,2	382	4,55 (pH 7,4)
Promethazin-HCl (ATOSIL, Bayer)	32,0	320	2,25 (pH 7,6)
Indomethazin (AMUNO, Sharp-Dohme)	35,8	358,8	
Phenylbutazon (BUTAZOLIDIN, Geigy)	30,8	308	2,33 (pH 7,4)
Na-Salicylat (DAB 7)	16,0	160	2,26
Methohexital-Na (BREVIMYTHAL-Na, Roche)	28,5	285	2,84
Thiopental-Na (PENTOTHAL, Abbot)	26,4	264	2,83 (pH 7,4)
Suramin-Na (GERMANIN, Bayer)	142,1	1421	-2,48
Phenprocoumon (MARCUMAR, Roche)	28,3	283	
Tolbutamid (RASTINON, Hoechst)	27,0	270	
Sulfadimethoxin (MADRIBON, Roche)	31,0	310	1,56 (pH 6,4)

metrisch bei 400 m μ , Anregungslicht 313 m μ .

P h e n y l b u t a z o n wurde nach der Methode von BURNS et al., 1953, bestimmt: nach Ansäuern mit 3n HCl Extraktion in Heptan, Reextraktion mit 2,5n NaOH. Messung bei 265 m μ .

T h i o p e n t a l wurde nach der Methode von BRODIE et al., 1950, bestimmt: nach Ansäuern mit 1,5m KH_2PO_4 -Puffer Extraktion mit Petroläther und Reextraktion mit 1n NaOH. Messung bei 315 m μ .

T o l b u t a m i d wurde bei pH 7,4 (0,05 m Phosphatpuffer) mit Amylacetat extrahiert. Nach Ansäuern mit 1n HCl Reaktion mit Dinitrofluorbenzol bei 140° (Glycerinbad). Messung bei 335 m μ (SPINGLER, 1957).

Alle verwendeten Reagenzien und Lösungsmittel, soweit nicht anders vermerkt, Fa.E. Merck, Darmstadt, p.a..

E R G E B N I S S E

Die untersuchten Substanzpaare (Primärsubstanz = PS, Sekundärsubstanz = SS), die Werte für β und α sowie die Zu- bzw. Abnahme des freien Anteils der Primärsubstanz in Anwesenheit der Sekundärsubstanz zeigt Tab.3. In Spalte 1 finden sich die Primärsubstanzen (PS) und die zusammen mit ihnen getesteten Sekundärsubstanzen (SS). Die Spalte 2 weist die Hb-Bindung (β) der PS im gleichen Versuch auf ($\pm$ Standardabweichung des Mittelwertes). Sie wurde bei jedem Paar getrennt bestimmt. Spalte 3 zeigt den freien Anteil (α) der PS vor und nach Zugabe der Sekundärsubstanz. Die relative Zu- bzw. Abnahme von α als Maß der Verdrängung bzw. Bindungszunahme (Minuszeichen) findet sich in Spalte 4. Dabei wurde der freie Anteil (α) vor Zugabe der SS gleich 100 gesetzt ($\Delta\alpha/\alpha \cdot 100$).

Die statistische Auswertung der Meßergebnisse erfolgte nach dem t-Test (STUDENT) auf dem Olivetti Computer Typ 101. Die Anwendung des t-Testes ist gerechtfertigt, da die Meßwerte einer Normalverteilung (STUDENT-Verteilung) folgen und sich die Varianzen der Mittelwerte entsprachen (DOCUMENTA GEIGY, 1969). Die Werte für p geben an, mit welcher Wahrscheinlichkeit die Unterschiede der Mittelwerte nicht zufällig sind.

Die verwendeten Substanzen sind - mit Ausnahme des Tolbutamid - stark an Hämoglobin gebunden ($\beta > 70\%$). Die in den einzelnen Versuchsreihen zu $n = 30$ Einzelanalysen ermittelten Werte für β bzw. α haben eine maximale Streuung des Mittelwertes von $\pm 0,3 \%$ innerhalb der PS/SS - Gruppen, ausgenommen Tolbutamid mit $\pm 1,5 \%$.

Tabelle 3

Substanzen	Hb - Bindung β (%) $\pm s_M$	freier Anteil α (%) $\pm s_M$ ohne SS mit SS	Zunahme des freien Anteils ($\frac{\Delta\alpha}{\alpha} \cdot 100$) (α ohne SS $\hat{=}$ 100)
Chlorpromazin (PS)			
mit Methohexital (SS)	95,8 $\pm$ 0,2	4,2 $\pm$ 0,2	-9,5 n = 30 p = n.s.
mit Indometacin (SS)	95,7 $\pm$ 0,2	4,3 $\pm$ 0,2	-7 n = 30 p = n.s.
mit Suramin (SS)	95,3 $\pm$ 0,3	4,7 $\pm$ 0,3	49 n = 30 p < 0,001
mit Phenylbutazon (SS)	95,7 $\pm$ 0,2	4,2 $\pm$ 0,2	65 n = 30 p < 0,001
mit Thiopental (SS)	95,9 $\pm$ 0,3	4,1 $\pm$ 0,3	151 n = 29 p < 0,001

PS = Primärsubstanz

SS = Sekundärsubstanz

n = Zahl der Versuche

n.s. = nicht signifikant (p > 0,1)

 s_M = Standardabweichung des Mittelwertes

Substanzen	Hb - Bindung β (%) $\pm s_M$	freier Anteil α (%) $\pm s_M$	Zunahme des freien Anteils ($\frac{\Delta\alpha}{\alpha} \cdot 100$) (α ohne SS $\hat{=}$ 100)
Phenprocoumon (PS)			
mit Sulfadimethoxin (SS)	87,3 $\pm$ 0,2	12,7 $\pm$ 0,2	7,3 $n = 30$ $p < 0,001$
mit Tolbutamid (SS)	87,5 $\pm$ 0,2	12,5 $\pm$ 0,2	8,8 $n = 30$ $p < 0,001$
mit Phenylbutazon (SS)	87,5 $\pm$ 0,2	12,5 $\pm$ 0,2	14,4 $n = 30$ $p < 0,001$
Tolbutamid (PS)			
mit Phenylbutazon (SS)	48,6 $\pm$ 1,5	51,4 $\pm$ 1,5	22 $n = 45$ $p < 0,001$

n = Zahl der Versuche

PS = Primärsubstanz

SS = Sekundärsubstanz

Tabelle 3

Substanzen	Hb - Bindung β (%) $\pm s_M$	freier Anteil		Zunahme des freien Anteils ($\frac{\Delta\alpha}{\alpha} \cdot 100$) (α ohne SS $\hat{=}$ 100)
		α (%) ohne SS	$\pm s_M$ mit SS	
Thiopental (PS)				
mit Phenylbutazon (SS)	74,4 $\pm$ 0,2	25,6 $\pm$ 0,2	28,6 $\pm$ 0,25	11,7 $n = 65$ $p < 0,001$
mit Salizylsäure (SS)	74,5 $\pm$ 0,3	25,5 $\pm$ 0,3	27,1 $\pm$ 0,3	6,3 $n = 30$ $p < 0,001$
mit Promazin (SS)	74,4 $\pm$ 0,3	25,6 $\pm$ 0,3	28,5 $\pm$ 0,3	11,6 $n = 30$ $p < 0,001$
mit Chlorpromazin (SS)	74,6 $\pm$ 0,2	25,4 $\pm$ 0,2	24,5 $\pm$ 0,3	- 3,5 $n = 30$ $p < 0,01$
Promazin (PS)				
mit Thiopental (SS)	92,6 $\pm$ 0,2	7,4 $\pm$ 0,2	5,3 $\pm$ 0,1	-27,2 $n = 30$ $p < 0,001$

PS = Primärschmerzmittel

SS = Sekundärschmerzmittel

n = Zahl der Versuche

 s_M = Standardabweichung des Mittelwertes

Tabelle 2

Substanzen	Hb - Bindung β (%) $\pm s_M$	freier Anteil α (%) $\pm s_M$ ohne SS mit SS	Zunahme des freien Anteils $(\frac{\Delta\alpha}{\alpha} \cdot 100)$ (α ohne SS $\pm$ 100)
Promethazin (PS)			
mit Thiopental (SS)	91,8 $\pm$ 0,2	8,2 $\pm$ 0,2 7,8 $\pm$ 0,2	-5 n = 30 p = n.s.
mit Suramin (SS)	91,5 $\pm$ 0,2	8,5 $\pm$ 0,2 10,4 $\pm$ 0,3	10,4 n = 30 p < 0,001
Desipramin (PS)			
mit Indomethazin (SS)	88,9 $\pm$ 0,3	11,1 $\pm$ 0,3 11,6 $\pm$ 0,2	4,5 n = 30 p = n.s.
mit Thiopental (SS)	88,4 $\pm$ 0,3	11,6 $\pm$ 0,3 11,0 $\pm$ 0,2	-5,5 n = 30 p = n.s.
Phenylbutazon (PS)			
mit Chlorpromazin (SS)	72,4 $\pm$ 0,4	27,6 $\pm$ 0,4 29,2 $\pm$ 0,4	4,1 n = 30 p < 0,001

Die Werte für α nach Zugabe der jeweiligen SS sind sehr unterschiedlich: es findet sich überwiegend eine Verdrängung der PS aus ihrer Hb-Bindung, in zwei Fällen aber eine Verstärkung der Bindung an Hämoglobin durch den Einfluß der Sekundärsubstanz.

Chlorpromazin wird - in steigendem Maße - von Suramin, Phenylbutazon und Thiopental aus seiner Hb-Bindung verdrängt (Zunahme von α um das 0,5 bis 1,5 fache des Ausgangswertes). Die ermittelten Unterschiede sind signifikant. Methohexital und Indomethazin haben keine gesicherte Wirkung auf die Bindung von Chlorpromazin.

Phenprocoumon wird in geringem Umfang - Zunahme von α zwischen 7,3 und 14,4 % des Ausgangswertes - durch Sulfa-dimethoxin, Tolbutamid und Phenylbutazon aus der Hb-Bindung verdrängt.

Tolbutamid wird von allen ausgewählten Primärsubstanzen am geringsten an Hämoglobin gebunden ($\beta = 48,6 \%$). Das selbst relativ höher gebundene Phenylbutazon ($\beta = 72,4 \%$) verdrängt es aus seiner Bindung (Zunahme von α um 22 % des Ausgangswertes).

Promethazin, eine sehr hoch gebundene Substanz ($\beta = 91,5 \%$), wird von Thiopental nicht signifikant in seiner Hb-Bindung beeinflusst, durch Suramin jedoch verdrängt (Zunahme von α um 10,4 % des Ausgangswertes).

Desipramin, ebenfalls hoch gebunden ($\beta = 88,9 \%$), wird durch Indomethazin und Thiopental nicht signifikant beeinflusst.

Phenylbutazon, das Chlorpromazin relativ stark verdrängt (s.o.), wird durch Chlorpromazin umgekehrterweise nicht in wesentlichem Umfang, jedoch signifikant aus seiner

Hb-Bindung verdrängt (um 4,1 %).

Thiopental wird von Phenylbutazon, Salizylsäure und Promazin gering bis mäßig stark aus seiner Hb-Bindung freigesetzt (Zunahme von α um 11,7 - 6,3 - 11,6 % des Ausgangswertes). Chlorpromazin verstärkt die Bindung des Thiopentals an Hämoglobin signifikant, jedoch in geringem Umfang.

Die Bindung von Promazin an Hb wird durch Thiopental als SS wesentlich verstärkt, der freie Anteil α erfährt eine Abnahme um 27,2 % des Ausgangswertes. Diese Verstärkung der Bindung läßt sich statistisch sichern.

Abbildung 1:

Ordinate: α_{PS} = freier Anteil der Primärsubstanz. Die gestrichelte Linie markiert α vor Zugabe der Sekundärsubstanz (die einzelnen Säulen haben nicht den gleichen Maßstab !). Die gepunktete Fläche entspricht der Zubzw. Abnahme von α nach Zugabe der SS ($\Delta\alpha$).

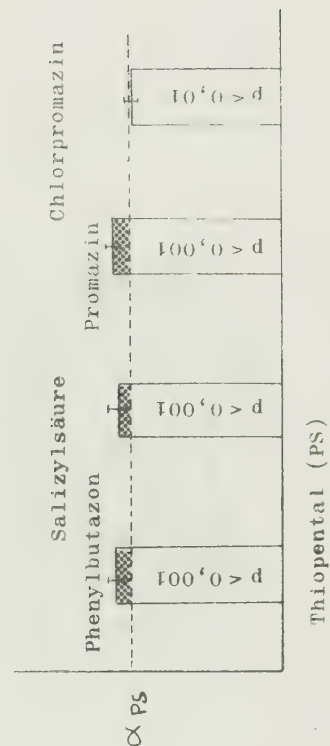
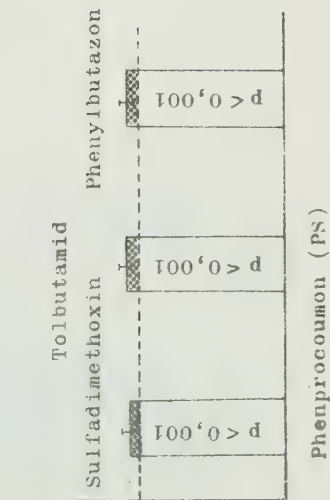
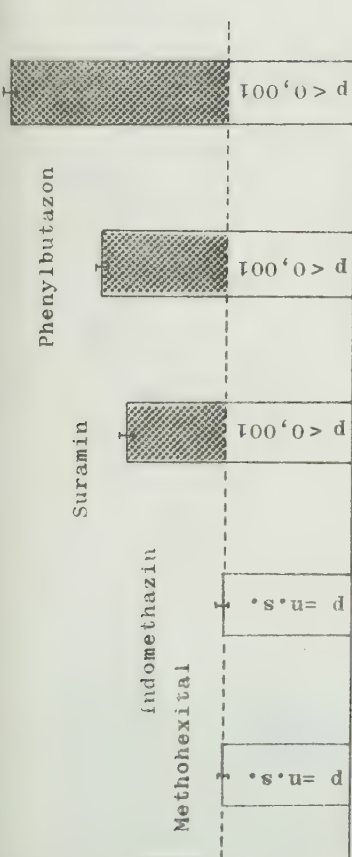
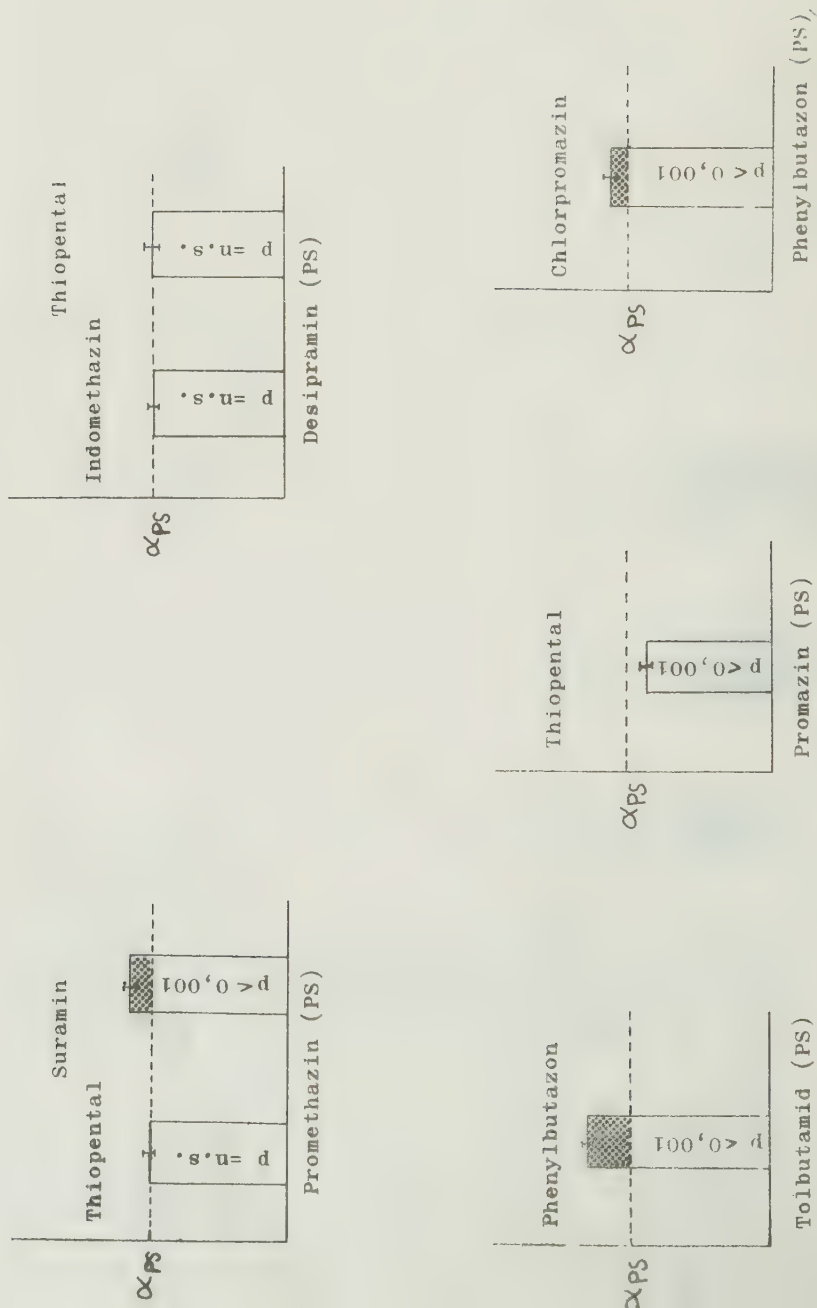


Abb. 1



DISKUSSION

Zur Methodik:

Die Gleichgewichtsdialyse ist unter den allgemein gebräuchlichen Methoden zur Untersuchung der Proteinbindung von Pharmaka die genaueste, wenn auch eine relativ aufwendige Methode (KURZ und TRUNK, 1967; KURZ, 1970). KRIEGLSTEIN, 1970, und LEVER, 1972, verglichen Filtrationsmethoden mit der Gleichgewichtsdialyse-Technik und fanden eine relativ gute Übereinstimmung ihrer Ergebnisse. Das Gleichgewicht zwischen gebundenem Anteil und freiem Anteil wird jedoch bei der Dialyse am wenigsten gestört (KURZ, 1970 b). Die Einstellung des Gleichgewichts bei Verwendung von Thiopental zeigt Abbildung 2. Bei Verwendung von Sulfadimethoxin ergaben sich vergleichbare Verhältnisse (HILZENBECHER, 1972).

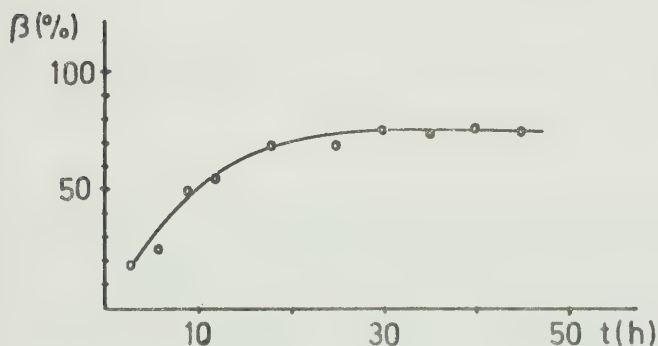


Abbildung 2:

Einstellung des Gleichgewichts in der verwendeten Dialysiervorrichtung. Dargestellt ist die Zunahme des gebundenen Anteils (β) in Abhängigkeit von der Zeit t (h) bis zur Einstellung des Dialyse-Gleichgewichts. Als Substanz wurde Thiopental in 10^{-4} molarer Konzentration verwendet. Konzentration der Hb-Lösung 25 g Hb/100 ml. Temp. $+4^{\circ}\text{C}$

Die Dialysemethoden weisen allgemein folgende Einschränkungen auf, die zu Fehlbestimmungen führen können (GARN und KIMBEL, 1961):

1. Adsorption der Substanzen an die Dialysiermembran,
2. DONNAN-Effekt,
3. Änderung der Eiweißkonzentration,
4. Änderung der Substanzkonzentration,
5. Blockade der Membranpassage durch Proteinmoleküle.

Durch Anpassung der Versuchsbedingungen wurden diese Fehlermöglichkeiten weitgehend ausgeschaltet:

Die Adsorption ist bei den einzelnen Substanzen verschieden stark ausgeprägt (HILZENBECHER, 1972). Durch die Versuchsanordnung mit entsprechenden Kontrollansätzen wurde ein möglicher Fehler eliminiert.

Der DONNAN-Effekt ist bei der pH-Einstellung im Dialysiersystem auf 7,4 zu vernachlässigen, da dieser pH nahe dem isoelektrischen Punkt von Hb liegt (6,66 für Hb_{ox} bzw. 6,8 für Hb_{red}).

Die konzentrierte Hb-Lösung in den Schläuchen bewirkte eine osmotische Wasseranziehung, was eine Verdünnung der Lösung zur Folge haben könnte. Dieser Effekt wurde dadurch gering gehalten, daß die Schläuche unter Druck verschlossen wurden. Das Ausmaß der Verdünnung wurde durch Wiegen der gefüllten Schläuche vor und nach der Dialyse ermittelt, es betrug nie mehr als $\pm 0,05$ g Hb pro 100 ml. Ein sich daraus ergebender Fehler ist zu vernachlässigen, da Konzentrationsänderungen dieser Größenordnung keine meßbaren Änderungen der Bindung

bewirken (vgl. Abbildung 3).

Die Dialysedauer von 40 Stunden gewährleistete in jedem Fall Gleichgewichtsverhältnisse (vgl. Abbildung 2).

Eine Blockade der Membranpassage ließ sich dadurch unwahrscheinlich machen, daß bei Zugabe der verwendeten Substanzen zur Innen- bzw. Außenflüssigkeit sich in beiden Fällen das selbe Gleichgewicht einstellte, ein ungehinderter Durchtritt in beiden Richtungen also möglich war.

Eine mikrobielle Besiedelung und daraus folgende Proteolyse sowie pH-Änderungen der Lösungen wurden dadurch verhindert, daß die Dialyse bei $+4^{\circ}\text{C}$ erfolgte. Der pH-Wert wurde kontrolliert und zeigte in keinem Fall eine Änderung.

Eine gleichmäßige Beschaffenheit des verwendeten Hb wurde dadurch erreicht, daß große Mengen Hämolysat aus einem Gemisch von zahlreichen Blutkonserven hergestellt wurden und das Hämolysat bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren gelagert wurde.

Das Hämolysat enthielt noch Bruchstücke der Erythrozytenmembranen. Diese Membranen können ebenfalls niedermolekulare Substanzen binden. Am intakten Erythrozyten fanden SCHANKER et al., 1961, eine Bindung an die Membranen bis zu 3 % der insgesamt gebundenen Menge. Um die Bindung an isolierte Membranen ("ghost"-Membranen) zu untersuchen, wurde in Anlehnung an die Methode von KWANT und SEEMAN, 1969, der entsprechende Wert für Chlorpromazin gemessen (10^{-4} molar in Phosphatpuffer pH 7,4). Nach erfolgter Gleichgewichtsdialyse waren 34 % des Chlorpromazin an die Membranen gebunden. In einem zweiten Versuch wurde die Bindung des Chlorpromazins in folgenden Systemen verglichen:

- a) Schlauchinhalt: intakte Erythrozytenlösung entsprechend 12 g Hb/100 ml,
- b) Schlauchinhalt: Hämolysat, entsprechend 12 g Hb pro 100 ml,
- c) Schlauchinhalt: reines Hämoglobin (hergestellt nach der Methode von KWANT und SEEMAN, 1969,), entsprechend 12 g Hb/100 ml.

Die Bindung ergab in a l l e n drei Systemen übereinstimmend 90 %. Daraus ist zu folgern, daß bei Anwesenheit von Hämoglobin die Bindung an die Membranen, wahrscheinlich infolge geringerer Bindungsaffinität, vernachlässigt werden und das Hämolysat stellvertretend für reine Hb-Lösungen angewendet werden darf.

Der Einfluß der Hb-Konzentration auf die Bindung:

Einerseits sollte die Konzentration der Versuchslösungen möglichst hoch sein, um der im Erythrozyten vorhandenen Hb-Konzentration von 30 - 34 g Hb/100 ml nahezukommen, andererseits war es aus methodischen Gründen (Viskosität !) notwendig, eine geringer konzentrierte Hb-Lösung zu verwenden. Um einen günstigen Bereich zu ermitteln, wurde folgender Versuch durchgeführt: Chlorpromazin wurde in 10^{-4} molarer Konzentration in verschiedenen Dialysesystemen mit steigenden Hb-Konzentrationen dialysiert, wobei die Intervalle zwischen den einzelnen Hb-Konzentrationen 3 bzw. 4 g Hb pro 100 ml betrugen. Wie Abbildung 3 zeigt, steigt die aus den Meßwerten erhaltene Kurve bis zu einem Bereich von etwa 16 g Hb/100 ml an und verläuft dann fast parallel der Abszisse. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Versuche eine einheitliche Hb-Konzentration von 25 g Hb/100 ml verwendet. Entsprechende Verhältnisse fand HILZENBECHER, 1972, für Sulfadimethoxin.

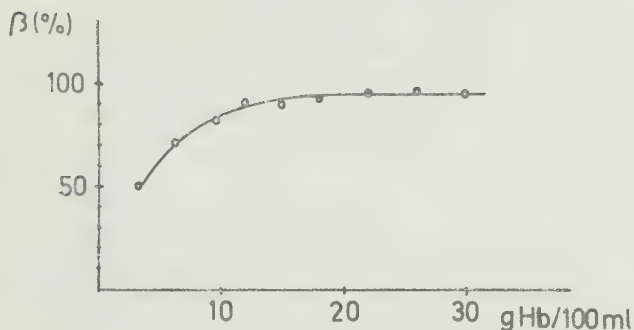


Abbildung 3:

Abhängigkeit des gebundenen Anteils (β) von der Konzentration der Hb-Lösung. Als Substanz wurde Chlorpromazin verwendet (Konzentration 10^{-4} molar). Dialyседauer 40 h. Temp. $+4^\circ\text{C}$.

Auswahl der Substanzpaare:

Für die Auswahl der Substanzen wurden folgende Gesichtspunkte beachtet:

1. Die lipophilen Eigenschaften einer Substanz sind für deren Penetration in die Erythrozyten maßgebend (SCHANKER, 1964; KURZ, 1970). Um eine Vergleichbarkeit der *in vitro* mit Hämolysat gewonnenen Ergebnisse mit intakten Erythrozyten zu gewährleisten, wurden solche Substanzen gewählt, die stark lipoidlöslich sind.
2. Eine chemische Reaktion der paarweise kombinierten Substanzen durfte nicht stattfinden. Aus diesem Grund wurden die verwendeten Substanzpaare mit dem Verfahren der "optischen und realen Mischung" geprüft (BAUR, 1969). Das Prinzip besteht darin, daß die Extinktion der Substanzen einmal in der selben

Küvette "real" gemischt und zum anderen getrennt in hintereinandergeschalteten Küvetten bei steigenden Wellenlängen gemessen werden. Die den Substanzen eigenen Absorptionsspektren müssen sowohl in der "realen" wie in der "optischen" Mischung gleich und voneinander abgrenzbar sein. Diese Bedingung wurde von allen Substanzpaaren erfüllt.

3. Die Primär- und Sekundärsubstanzen dürfen sich gegenseitig bei der Analyse nicht stören. Die Sekundärsubstanzen wurden deshalb zunächst allein dem Analysengang der jeweiligen Primärsubstanz unterzogen. Dann wurde zur Kontrolle eine isomolar konzentrierte Mischung beider Substanzen dem Analyseverfahren der Primärsubstanz unterzogen und deren Ergebnis mit dem einer Analyse der Primärsubstanz allein in gleicher Konzentration verglichen. Bei den gewählten Konzentrationen (10^{-4} molar) kam es zu keiner gegenseitigen Beeinflussung.
4. Die Primärsubstanz sollte eine möglichst hohe Bindung an Hämoglobin erwarten lassen, da bei quantitativer Betrachtung der Verdrängungsphänomene theoretisch nur hier wesentliche Gesamteffekte für die pharmakologische Wirkungsänderung zu erwarten wären.

Gesamtfehler der Methode:

Die Genauigkeit der Methode ergibt sich aus den Variationskoeffizienten der Mehrfachbestimmungen ($n \geq 30$) von Parallelansätzen:

$$v(\%) = \frac{s \cdot 100}{\bar{x}}$$

s = Standardabweichung der Stichprobe

$\bar{x}$ = arithmetischer Mittelwert

An folgenden Substanzen wurde die Präzisionsberechnung durchgeführt:

I. Thiopental

$$s = 1,803; \quad \bar{x} = 74,4; \quad n = 65$$

$$v = 2,41 \%$$

Ia. Thiopental mit Phenylbutazon

$$s = 2,1; \quad \bar{x} = 71,4; \quad n = 65$$

$$v = 2,94 \%$$

II. Phenprocoumon

$$s = 0,88; \quad \bar{x} = 87,5; \quad n = 30$$

$$v = 1,01 \%$$

IIa. Phenprocoumon mit Phenylbutazon

$$s = 0,95; \quad \bar{x} = 87,5; \quad n = 30$$

$$v = 1,09 \%$$

Es zeigt sich, daß die Genauigkeit der Methode bei zahlreichen Parallelbestimmungen in einem für biologische Messungen sehr guten Bereich liegt. Die Werte für die Hb-Bindung der Primärschubstanz nach Zugabe der Sekundärschubstanz sind bezüglich ihres Fehlers kaum ungünstiger als die bei der PS allein bestimmten.

Zu den Ergebnissen:

In der Literatur über die Bindung von Substanzen an Proteine werden von einigen Autoren (KRIEGLSTEIN, 1969; BAUR, 1969; HILZENBECHER, 1972) der nach vollständiger Gleichgewichtseinstellung gebundene Anteil β bzw. der freie Anteil α der Substanz angegeben. Andere Untersucher errechnen die Affinitäts- oder Bindungskonstante K , welche für eine einzige Bindungsstelle des Proteinmoleküls und die sich anlagernde Substanz eine Kenngröße darstellt, die sich aus dem Massenwirkungsgesetz ableiten läßt (Literaturübersicht bei MEYER und GUTTMAN, 1968). Auf die mathematischen Zusammenhänge soll hier nicht näher eingegangen werden. Übereinstimmung besteht darin, daß bei Untersuchung der Bindungseigenschaften komplexer Systeme, wie z.B. des Plasmas, wegen der Vielzahl der Bindungsstellen mit unterschiedlicher Affinität für die gleiche Substanz eine Berechnung von Bindungskonstanten nicht möglich ist (MARTIN, 1965; MEYER und GUTTMAN, 1968). Auch beim Hämoglobin sind die Bindungsstellen und insbesondere die Einflüsse der komplizierten Struktur auf das Bindungsverhalten noch nicht genau bekannt, weshalb eine Angabe der im Gleichgewicht vorhandenen, relativen Bindungsgrößen als ausreichend angesehen werden kann.

Mit Untersuchungen zur Frage der Bindung niedermolekularer Substanzen an Hämoglobin haben sich wenige Autoren beschäftigt. WITZGALL und BOYENS, 1964, bestimmten die Verteilung von Sulfonamiden innerhalb des Körpers und ermittelten auch den relativen Anteil der in den Erythrozyten gelösten bzw. gebundenen Substanzmenge, ohne näher auf die Frage einer Bindung an Hämoglobin einzugehen.

SCHANKER, 1964, beschäftigte sich mit dem Mechanismus der Erythrozytenmembran-Penetration und konnte nachweisen, daß organische Anionen selbst bei geringer Lipoidlöslichkeit schnell permeieren, während kationische Substanzen nur bei hoher Lipophilie in kurzer Zeit eindringen. Die Bindung an Hämoglobin wurde nur für Phenolrot und Sulfosalizylsäure mit Ultrafiltrationstechnik bestimmt.

Die erste systematische Untersuchung findet sich bei KIEHS et al., 1966, in der eine Reihe von aromatischen Verbindungen auf ihre Bindung an Rinderhämoglobin geprüft wurden. Die Autoren wandten ein Gleichgewichtsdialyseverfahren an, benutzten jedoch im Vergleich zu dieser Arbeit eine 100-fach geringer konzentrierte Hb-Lösung ($3,7 \times 10^{-5}$ molar). Sie stellten eine enge Korrelation zwischen hydrophoben Eigenschaften und Ausmaß der Hb-Bindung fest, weshalb sie der hydrophoben Wechselbeziehung als beim Hämoglobin entscheidender Bindungsart größere Bedeutung als den polaren Bindungsformen beimessen. Außerdem vertreten sie die Ansicht, daß diese Substanzen innerhalb der Subunits des Hämoglobins im hydrophoben Milieu "festgehalten" werden müßten, da die gleichen Stoffe von Myoglobin-Präparationen nicht entsprechend gebunden werden.

Durch ihre Untersuchungen mit dem stark lipophilen Pharmakon Chlorpromazin belegten JÄHNCHEN und Mitarbeiter, 1971, an einem vereinfachten Blutmodell die Annahme, daß diese Substanzen in viel wesentlichem Ausmaß in Erythrozyten gebunden werden als am Albumin.

HILZENBECHER, 1972, ermittelte für eine Vielzahl pharmakologisch wirksamer Substanzen den an Humanhämoglobin gebundenen Anteil. Da die Methodik der Gleichgewichtsdialyse sowie die mathematische Formulierung mit dieser Arbeit im wesentlichen übereinstimmen, sind direkte

Vergleiche möglich. Die für den gebundenen Anteil B bestimmten Werte entsprechen - unter Berücksichtigung möglicher, geringer methodischer Unterschiede - den hier gefundenen weitgehend. Für Phenprocoumon und Tolbutamid existieren keine Vergleichswerte in der Literatur. Verglichen mit der Plasmaprotein-Bindung (SEILER und DUCKERT, 1968) ist die Bindung von Phenprocoumon an Hämoglobin niedriger (β für Hb 87,5 %, für Plasma 99 %). Tolbutamid wird im Plasma zu 95,5-97,1 % gebunden (β für Hb 48,6 %), also doppelt so hoch wie an Hämoglobin (CHRISTENSEN et al., 1963, Gleichgewichtsdialysetechnik). Dieser Umstand kann nur durch eine unterschiedliche Bindungsaffinität erklärt werden.

Die Bindung von Chlorpromazin an Erythrozyten und deren Beeinflussung durch Zweitsubstanzen wurden kürzlich von HAHN et al., 1973, an einem vereinfachten Blutmodell (Erythrozyten in Albuminlösung) untersucht. Sie ermittelten für den im intakten Erythrozyten gebundenen Anteil mit der Sephadex-Geofiltrationsmethode einen Wert von etwa 68 % - in Anwesenheit von Albumin. Die Konzentration der Primärsubstanz Chlorpromazin war, wie in dieser Untersuchung, 10^{-4} molar, die der Sekundärsubstanz jedoch 10^{-3} molar. Die Menge an Hämoglobin war nur halb so groß. Bei ausschließlicher Anwesenheit von Erythrozyten in einer Puffer-Substanz-Lösung erhielten sie eine Bindung von 96,5 %, was mit dem hier gefundenen Wert für β (95,8 %) gut übereinstimmt. Eine Reihe von Pharmaka konnten Chlorpromazin aus seiner Bindung in den Erythrozyten freisetzen, unter anderem Phenylbutazon und Thiopental, andere - Suramin, Imipramin und Salizylsäure - erhöhten jedoch den in den Erythrozyten gebundenen Anteil, was mit einer relativen Erhöhung der Bindungsaffinität des gleichzeitig anwesenden Albumins für diese Substanzen erklärt wird.

GIGG et al. berichteten bereits 1956 über die Verstärkung der Antikoagulantien-Wirkung der Dicoumarole durch Phenylbutazon. Erst von SEILER und DUCKERT, 1968, wurde die Plasmaprotein-Bindung des Phenprocoumons gut untersucht (Ultrafiltrationsmethode, Gesamtplasma). Sie fanden bei therapeutischen Konzentrationen im Plasma eine extrem hohe Bindung von 99 %. Sulfadimethoxin, Tolbutamid und Phenylbutazon verursachten eine erhebliche Zunahme des freien Anteils von 1 auf 16 % bzw. auf 11 % bzw. auf 19 %. Die letzten beiden Substanzen zeigen also bei ihrer Wirkung auf die Bindung an Plasmaproteine einen Effekt, der den in diesen Versuchen am Hb beobachteten um das 7-bis 20-fache übersteigt. Auf die mögliche Bedeutung dieses Unterschieds wird später noch eingegangen. Es soll hier erwähnt werden, daß die Autoren bei ihren späteren in vivo - Versuchen keineswegs eine Korrelation zwischen Zunahme von α und Verstärkung der Antikoagulantien-Wirkung fanden - ein für sie nicht erklärbares Phänomen.

Mögliche Einflüsse von Substanzen auf die Bindung des Tolbutamids an Plasmaproteine wurden von CHRISTENSEN et al., 1963, DUBACH et al., 1966, sowie von JUDIS, 1973, untersucht, nachdem bekannt wurde, daß mit Sulfonharnstoffen behandelte Diabetiker bei gleichzeitiger Verabreichung anderer Medikamente eine bedrohliche Hypoglykämie entwickeln konnten. So verdrängen manche Sulfonamide, Dicoumarol-Derivate, Steroide und einige weitere Stoffe Tolbutamid in wechselndem Ausmaß aus seiner Bindung an Plasmaproteine bzw. Albumin. Unsere Untersuchungen ergeben eine mäßige Verdrängung des Tolbutamids durch Phenylbutazon aus seiner Bindung an Hämoglobin mit einer Zunahme des freien Anteils α um 22 % des Ausgangswertes (Erhöhung von α von 51,4 % auf 60,6 %). Im Vergleich dazu geben CHRISTENSEN und Mitarbeiter, 1963, am Plasmaprotein ebenfalls eine, wenn auch wesentlich geringere Erhöhung des freien Anteils

an: von 6,6 % auf 7,9 % bei einer Phenylbutazon-Konzentration von $0,25 \cdot 10^{-3}$ molar bzw. von 9,6 % auf 11,2 % bei einer Konzentration von $0,5 \cdot 10^{-3}$ molar.

Der Einfluß von Phenylbutazon und Chlorpromazin auf die Plasmabindung des Thiopentals wurde von BAUE, 1969, untersucht. Er stellte fest, daß Phenylbutazon die Bindung des Thiopentals verstärkt - Abnahme von α um 12,8 % des Ausgangswertes -, während wir eine geringe Verdrängung am Hb beobachten konnten. Anders verhielt sich Chlorpromazin, das im Plasma Thiopental nicht signifikant beeinflusste, am Hb jedoch eine geringe Zunahme des an Hb gebundenen Thiopental-Anteils verursachte.

Zum Einfluß verschiedener Faktoren auf die Wechselwirkung Primär-/Sekundärsubstanz:

Zuerst wurde geprüft, ob zwischen der Hydrophobie der verwendeten Pharmaka und dem Ausmaß der Beeinflussung eine Beziehung besteht. Zur Charakterisierung der Hydrophobie wurden die Verteilungskoeffizienten der einzelnen Substanzen im System Octanol-Wasser herangezogen (vgl. Tabelle 2). Eine sichere Beziehung zwischen Lipophilie und Beeinflussung der Bindung war nicht herzustellen, derart, daß mit steigendem oder fallendem Verteilungskoeffizienten eine parallele Änderung der Hb-Bindung erfolgte.

Eine mögliche Beziehung zwischen Hb-Bindung der Sekundärsubstanzen selbst und der beobachteten Beeinflussung der Bindung der Primärsubstanz ließ sich ebenfalls nicht sichern.

Bei den Substanzpaaren wurden überwiegend organische Säuren als Sekundärsubstanzen mit Basen als Primärsubstanzen getestet. Die dabei auftretenden Verdrän-

gungseffekte sprechen dafür, daß auch bei der Bindung an Hämoglobin die Hypothese nicht zutrifft, daß Säuren nur Säuren und Basen nur Basen verdrängen könnten, wie es von ANTON, 1961, und KEEN, 1966, angenommen wurde.

Schlußfolgerungen

Versucht man, die Bedeutung einer Freisetzung aus der Proteinbindung quantitativ zu erfassen, so muß man alle an der Verteilung des Pharmakons beteiligten Flüssigkeitsräume mitberücksichtigen: intravasales Compartment - neben anderen zellulären Bestandteilen aus Plasmaproteinen und Erythrozyten bestehend - , interstitielles Compartment und intrazellulärer Raum. Setzt man beispielsweise von einem zu 95 % an Plasmaproteine und ebenso hoch an Hämoglobin gebundenen Pharmakon 10 % durch Einwirkung einer Sekundärsubstanz frei, so erfolgt eine Zunahme des freien Anteils α von 5 auf 15 %, d.h. auf das 3-fache. Diese freigesetzte Menge diffundiert durch die Gefäßwand zunächst in den interstitiellen Raum und von da aus in den Intrazellulärraum. Setzt man einmal voraus, daß keinerlei Bindung an intrazelluläre Proteine erfolgt, so beträgt die verbleibende Konzentration im intravasalen Compartment (freier Anteil) nicht mehr das 3-fache sondern nur noch um ein Fünftel des Ausgangswertes mehr als vor Zugabe der Sekundärsubstanz. Ein zusätzlicher und schwer zu bestimmender Einfluß auf die quantitative Verteilung ist durch die intrazelluläre Proteinbindung (Muskel, Gehirn, Leber etc.) zu erwarten. Eine Konzentrationszunahme des freien Pharmakons um insgesamt ein Fünftel pro Gesamtkörper-

wasser kann eine erhebliche Steigerung der Arzneimittelwirkung zur Folge haben, die bis zur Intoxikation gehen kann.

Im Gegensatz dazu wird bei einer Substanz, die nur zu 50 % an Plasmaproteine und Hämoglobin gebunden ist und deren freier Anteil bei Anwesenheit einer Sekundärsubstanz von 50 auf 60 % erhöht wird, nur eine relative Zunahme von α um ein Fünftel des Ausgangswertes stattfinden. Verteilt man diesen zusätzlich freigesetzten Anteil auf das Gesamtkörperwasser, so ergibt sich nur noch eine Zunahme um ein Fünzigstel, eine pharmakologisch wenig bedeutsame Veränderung.

Nimmt man an, daß bei einer Primärsubstanz die Bindung an Plasmaproteine wesentlich höher als die an Hb ist, so ergeben sich andere Verhältnisse. Wird beispielsweise ein Pharmakon zu 95 % an Plasmaproteine und nur zu 50 % an Hb gebunden, so führt eine Verdrängung um jeweils 5 % (Abnahme von β auf 90 % bzw. 45 %) zu einem unterschiedlichen Effekt: der freie Anteil α steigt im Plasma auf das Doppelte des Ausgangswertes (von 5 auf 10 %), der im Erythrozyten nur um ein Zehntel an (von 50 auf 55 %). Bezogen auf das Gesamtkörperwasser wird die Konzentrationszunahme viel geringer sein, als wenn die Bindung an Hb ebenso hoch wäre wie die an Plasmaproteine.

Bezieht man diese Überlegung auf die Untersuchung von Phenprocoumon, bei dem ähnliche Verhältnisse vorliegen, so ergibt sich eine Erklärungsmöglichkeit für die widersprüchlichen Befunde von SEILER und DUCKERT (s.o.). Der - unerwartet - geringe in *v i v o* -Effekt bei gleichzeitiger Gabe von in *v i t r o* stark verdrängenden Substanzen könnte Folge der niedrigeren Hb-Bindung des Phenprocoumons und der geringeren Verdrängung durch die erwähnten Sekundärsubstanzen sein.

MEYER und GUTTMAN, 1968, wiesen darauf hin, daß Verdrängungsphänomene nur bei hochgebundenen Substanzen eine praktische Bedeutung erwarten lassen, wobei sie sich auf die bis dahin publizierten Untersuchungen zur Plasmaprotein-Bindung bezogen. Diese Feststellung trifft, wie aus den obengenannten Beispielen zu erkennen ist, grundsätzlich auch für die Hb-Bindung zu, erfährt jedoch dadurch eine Erweiterung, daß die Hb-Konzentration viermal so hoch wie die Albumin-Konzentration bzw. 2,2-mal so hoch wie die aller Plasmaproteine ist, eine Freisetzung aus der Hb-Bindung um den gleichen relativen Wert also eine wesentlich höhere absolute Mengenzunahme bedeutet.

Vergleicht man diese allgemeinen Vorstellungen mit den hier gewonnenen Ergebnissen, so sind für die pharmakologische Wirkung theoretisch bedeutsame Veränderungen bei den Substanzpaaren Chlorpromazin - Suramin, Chlorpromazin - Phenylbutazon und insbesondere bei Chlorpromazin - Thiopental zu erwarten, da nur dort eine hohe relative und absolute Zunahme des freien Anteils zu beobachten ist.

Weiterhin läßt sich feststellen, daß es zur Beurteilung einer gegenseitigen Beeinflussung von Pharmaka bei ihrer Bindung an Eiweiß nicht ausreicht, nur Untersuchungen mit Plasmaproteinen durchzuführen. Denn es sind pharmakologisch bedeutsame Veränderungen nur dann zu erwarten, wenn auch am Hämoglobin eine wesentliche Verdrängung auftritt. Bindungsbestimmungen sollten also immer auch mit Hämoglobin durchgeführt werden.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, eine mögliche, gegenseitige Beeinflussung verschiedener Arzneimittel bei ihrer Bindung an Humanhämoglobin zu untersuchen. Es zeigten sich folgende Ergebnisse:

1. Bei der Mehrzahl der getesteten Substanzpaare fand eine Verdrängung der Primärsubstanzen aus ihrer Hb-Bindung statt, in wesentlichem Umfang jedoch nur bei Chlorpromazin als Primärsubstanz durch Suramin, Phenylbutazon und Thiopental ($p < 0,001$)
2. Eine geringfügige Zunahme der Bindung der Primärsubstanz durch den Einfluß der Sekundärsubstanz war bei den Substanzpaaren Promazin - Thiopental und Thiopental - Chlorpromazin zu beobachten ($p < 0,001$).

Diese Ergebnisse lassen - verglichen mit den Befunden anderer Autoren - folgende Schlußfolgerungen zu:

1. Die bei der Plasmaprotein-Bindung bekannten Wechselwirkungen - Verdrängung sowie Bindungszunahme - lassen sich grundsätzlich auch am Hämoglobin nachweisen. Es läßt sich jedoch zwischen den am Plasmaprotein und am Hb gewonnenen Ergebnissen keine Beziehung herstellen, d.h. Substanzpaare, die sich in ihrer Plasmaprotein-Bindung beeinflussen, müssen dies nicht auch am Hb zeigen; es kann sogar zu gegenteiligen Effekten kommen.
2. Pharmakologisch bedeutsame Gesamteffekte durch eine gegenseitige Beeinflussung sind nur dann zu erwarten, wenn am Plasmaprotein u n d am Hb zugleich eine ausgeprägte Verdrängung stattfindet. Für diese Feststellung sind zusätzlich zur Untersuchung mit Plasmaproteinen solche mit Hb erforderlich.

Die verwendete Gleichgewichtsdialyse-Technik wurde eingehend beschrieben.

L I T E R A T U R - V E R Z E I C H N I S

ANTON, A.H. (1960): The relation between the binding of sulfonamides to albumin and their antibacterial efficiency. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 129: 282-290

ANTON, A.H. (1961): A drug induced change in the distribution and renal excretion of sulfonamides. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 134: 291-303

ANTON, A.H. (1968): The effect of disease, drugs, and dilution on the binding of sulfonamides in human plasma. *Clin. Pharm. Ther.* 9: 561-567

BAKER, H., O. FRANK, J. FEINGOLD and C.M. LEERY (1967): Vitamin distribution in human plasma proteins. *Nature (London)* 215: 84-85

BAUR, J. (1969): Die Beeinflussung der Bindung von Arzneimitteln durch andere Stoffe und die Bedeutung dieses Vorgangs für die pharmakologische Wirkung. Inaugural-Dissertation, München

BIRD, A.E. and A.C. MARSHALL (1967): Correlation of serum binding of penicillins with partition coefficients. *Biochem. Pharmac.* 16: 2275-2289

BRODIE, B.B. and J. AXELROD (1950): The fate of aminopyrine (pyramidon) in man and methods for the estimation of aminopyrine and its metabolites in biological material. *J. Pharmacol.* 99: 171-184

BRODIE, B.B., L.C. MARK, E.M. PAPPER, P.A. LIEF, E. BERNSTEIN, and E.A. ROVINSTEIN (1950): The fate of thiopental in man and a method for its estimation in biological material. *J. Pharmacol.* 98: 85-96

BRODIE, B.B. and C.A.M. HOGGEN (1957): Some physico-chemical factors in drug action.

J. Pharm. Pharmacol. 9: 345-380

BURNS, J.J., R.K. ROSE, T. CHENKIN, A. GOLDMAN, A. SCHULERT, and B.B. BRODIE (1953): The physiological disposition of phenylbutazone in man and a method for its estimation in biological material.

J. Pharmacol. 109: 346-357

CHRISTENSEN, L.K., J.M. HANSEN, and M. KRISTENSEN (1963): Sulfaphenazol-induced hypoglycaemic attacks in tolbutamide treated diabetics.

Lancet, II 1963: 1298-1302

Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 7. Auflage
J.R. Geigy AG, Pharma, Basel 1969, S. 172 f

DUBACH, U.C., A. BÜCKERT und J. RAABFLAUB (1966): Einfluß von Sulfonamiden auf die blutzuckersenkende Wirkung oraler Antidiabetica.

Schweiz. Med. Wschr. 96: 1483-1486

FRANZ, J.W., E. JÄHNCHEN und J. KRIEGLSTEIN (1969):

Der Einfluß verschiedener Pharmaka auf das Bindungsvermögen einer Albuminlösung für Promazin und Chlorpromazin.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. 264: 462-475

GARN, F.W. und K.H. KIMBEL (1961): Verbleib und Ausscheidung von Depotsulfonamiden.

Arzneimittel-Forsch. 11: 701-707

GIGG, A., H. PESTALOZZI, A. CLAUS und F. KOLLER (1956): Verstärkung der Antikoagulation-Wirkung durch Butazolidin.

Schweiz. Med. Wschr. 86: 1194-1197

GOLDSMITH, R.E., I.L.RANK, M.KLOTH, and J.DAHLGREEN(1967):
Observations on the relationship between the maximal
thyroxine binding capacities of thyroxine-binding inter
alpha globulin and thyroxine-binding prealbumin, the
serum protein bound iodine concentration and sexual
maturity in adolescents.

Acta endocr.(Kbh) 54: 494-505

HAHN, I., G.KRIEGLSTEIN, J.KRIEGLSTEIN, and K.TSCHENT-
SCHER(1973): Distribution of chlorpromazine in a simpli-
fied blood influenced by various drugs.

Arch.Pharmacol. 278: 35-44

HANSCH, C., P.P.MALONEY, and T.FUJITA(1962): Correlation
of biological activity of phenoxyacetic acids with
Hammett substituent constants and partition coefficients.
Nature (London) 194: 178-180

HILZENBECHER, C.(1972): Die Bindung von Pharmaka an
Humanhämoglobin.

Inaugural-Dissertation, München

HUTCHINSON, C.(1952): The behaviour of human erythrocytes
in aqueous alcohol solutions.

Arch.Biochem.Biophys. 38: 35-41

JÄHNCHEN, E., J.KRIEGLSTEIN und G.KUSCHINSKY(1968):
Über den Einfluß saurer Substanzen auf die Bindung von
Promazin an Rinderserumalbumin.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmak. 260: 147

JUDIS, J.(1973): Displacement of sulfonylureas from human
serum proteins by coumarin derivatives and cortical
steroids.

J.Pharmaceut.Sci. 62: 233-237

KAUZMANN, W.(1959): Some factors in the interpretation
of protein denaturation.

Advan.Prot.Chem. 14: 1-57

KEEN, P.M. (1966): The displacement of three anionic drugs from binding to bovine serum albumine by various anionic compounds.

Brit. J. Pharmacol. Chemother. 26: 704-712

KIEHS, K., C. HANSCH, and L. MOORE (1966): The role of hydrophobic bonding in the binding of organic compounds by bovine hemoglobin.

Biochemistry 5: 2602-2605

KLOTZ, J.M. and J.M. URQUART (1949): The binding of organic ions by proteins. Buffer effects.

J. Phys. Colloid. Chem. 53: 100-109

KRIEGLSTEIN, J. (1969): Zur Plasmaproteinbindung von Arzneimitteln.

Klin. Wschr. 47: 1125-1130

KRIEGLSTEIN, J. (1970): Bestimmung der Eiweißbindung von Pharmaka mit Hilfe der Sephadex-Gelfiltration.

Beilage zu einem Teil der Auflage von Fresenius' Zeitschrift f. analyt. Chemie, Bd. 252, Heft 4/5, S. 11

KUNIN, C.M. (1965): Inhibitors of penicillin binding to serum proteins.

J. Lab. Clin. Med. 65: 416-431

KUNIN, C.M. (1966): Clinical pharmacology of the new penicillins. II. Effect of drugs which interfere with binding to serum proteins.

Clin. Pharmacol. Ther. 7: 180-188

KURZ, H. und WALLER, H.D. (1955): Die Genauigkeit der optischen Bestimmung von Kohlenoxyd-Hämoglobin im Blut.

Arch. Toxikol. 15: 291-305

KURZ, H. und H. TRUNK (1967): Some interfering factors in determining the protein bound fraction of chemotherapeutics.

V. Internationaler Kongress f. Chemotherapie, Wien

KURZ,H.(1970 a): Die Bedeutung der Lipoidlöslichkeit in der Pharmakologie.

Präp. Pharmazie 6: 1-12

KURZ,H.(1970 b): Analytische Probleme bei der Bestimmung der Proteinbindung durch Ultrafiltration, Ultrazentrifugation und Dialyse.

Beilage zu einem Teil der Auflage von Fresenius'Zeitschrift f. analyt. Chemie, Bd. 252,Heft 4/5, S.9-10

KWANT,W.O. and P.SEEMAN(1969): The membrane concentration of a local anesthetic (chlorpromazine).

Biochim.Biophys.Acta 183: 530-542

LAIKEN,N. and G.NÉMETHY(1971): A new model for the binding of flexible ligands to proteins.

Biochemistry 10: 2101-2106

LEO,A., C.HANSCH and D.ELKINS(1971): Partition coefficients and their uses.

Chem. Rev. 71: 525-615

LEVER,J.E.(1972): Quantitative assay of the binding of small molecules to protein: comparison of dialysis and membrane filter assays.

Anal. Biochem. 50: 73-83

LUNDE,P.K.M., A.RANE, S.J.YAFFE, L.LUNDE and F.SJÖQUIST(1970): Plasma protein binding of diphenylhydantoin in man. Interaction with other drugs and the effect of temperature and plasma dilution.

Clin.Pharmacol.Ther. 11: 846-854

MARTIN,B.K.(1965): Potential effect of the plasma proteins on drug distribution.

Nature (London) 207: 274-276

MEYER, M.C. and D.E. GUTTMAN (1968): The binding of drugs by plasma proteins.

J. Pharmaceut. Sci. 57: 895-916

DeMOOR, P. and W. HEYNS (1968): Cortisol binding affinity of plasma transcortin (CBA) as studied by competitive absorption.

J. Clin. Endocr. 28: 1281-1286

NÉMETHY, G. (1967): Hydrophobe Wechselwirkungen.

Angew. Chemie 79: 260

NETTER, H. (1967): Theoretische Biochemie.

Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1959, S. 186, 290

RIKKERS, H. and H.F. DeLUCA (1967): An invivo study of the carrier proteins of ^3H -vitamins D_3 and D_4 in rat serum.

Amer. J. Physiol. 213: 380-386

ROSENBAUM, W., N.P. CHRISTY, and W.G. KELLY (1966):

Electrophoretic evidence for the presence of an estrogen-binding betaglobulin in human plasma.

J. Clin. Endocr. 26: 1399-1403

SCATCHARD, G. (1949): The attractions of proteins for small molecules and ions.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 51: 660-674

SCHANKER, L.S., P.A. NAFPLIDIS, and J.M. JOHNSON (1961):

Passage of organic bases into human red cells.

J. Pharmacol. 133: 325-331

SCHANKER, L.S., J.M. JOHNSON, and J.J. JEFFREY (1964):

Rapid passage of organic anions into human red cells.

J. Physiol. 207: 503-508

SCHOLTAN, W. (1964): Die Bindung der Sulfonamide an Eiweißkörper.

Arzneimittel-Forschung 18: 505-517

SEILER, K. und F. DUCKERT (1968): Properties of 3-(1-phenyl-propyl)-4-oxycoumarin (Marcoumar^R) in the plasma when tested in normal cases and under the influence of drugs. *Thromb. Diath. Haem.* 19: 389-395

SOLOMON, H. M. and J. J. SCHROGIE (1967): The effect of various drugs on the binding of Warfarin-¹⁴C to human albumin. *Biochem. Pharmacol.* 16: 1219-1226

SOLOMON, H. M., J. J. SCHROGIE, and D. WILLIAMS (1968): The displacement of phenylbutazone-¹⁴C and Warfarin-¹⁴C from human albumin by various drugs and fatty acids. *Biochem. Pharmacol.* 17: 143-151

SPINGLER, H. (1957): Über eine Möglichkeit zur colorimetrischen Bestimmung von N-(4-Methyl-benzyl-sulfonyl)-N-butyl-Harnstoff im Serum. *Klin. Wschr.* 35: 533-535

WEDER, H. J. (1970): Interaction of drugs with proteins. II. Experimental data and thermodynamics of binding reactions of thymoleptic drugs and model dyes. *J. Pharmaceut. Sci.* 59: 1563-1569

WITZGALL, H. und H. BOYENS (1964): Die Bedeutung der Bindung an Albumin, Körperzellen und Bakterien für Pharmakodynamik und Wirkung von Arzneistoffen. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 148: 511-535

WISHINSKY, H., E. GLASSER, and S. PERKAL (1962): Protein interactions of sulfonylurea compounds. *Diabetes* 11: Suppl. 18

Die Arbeit wurde durch ein Promotions-Stipendium nach dem Graduierten-Förderungs-Gesetz gefördert.

Herrn Prof. Dr. Kurz danke ich für die Überlassung des Themas sowie für wertvolle Anregungen bei der Durchführung der Untersuchungen.

Herrn Prof. Dr. M. Kiese danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes und für die Übernahme des Korreferates.

Lebenslauf

Am 25.4.44 wurde ich als Tochter des Architekten Walter Bauer und seiner Frau Kläre in Schorndorf, Baden-Württemberg, geboren. Von 1950 - 1964 besuchte ich Volksschule und Gymnasium in Schorndorf. Nach dem Abitur studierte ich zwischen 1964 und 1970 an der Universität München Medizin und legte am 15.7.1970 mein Staatsexamen ab. Nach der Medizinalassistentenzeit erhielt ich im November 1971 die Approbation als Arzt.

Vom 1.12.71 bis 30.11.73 erhielt ich für die Anfertigung dieser Arbeit ein Promotionsstipendium nach dem Graduierten-Förderungsgesetz.

Seit dem 1.2.74 bin ich als Assistenzärztin in der Anästhesie-Abteilung der Chirurgischen Universitätsklinik, München, angestellt.

